

## СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *GH*, *PRL*, *Pit-1* И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КОРОВ С МОРФОЛОГИЕЙ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ *POST MORTEM*

М.В. ПОЗОВНИКОВА<sup>1</sup>, Л.Н. РОТАРЬ<sup>2</sup>, А.А. КУДИНОВ<sup>1</sup>, Н.В. ДЕМЕНТЬЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», лаборатория молекулярной генетики, Санкт-Петербург, Пушкин, 196625, Санкт-Петербург, Пушкин, пос. Тярлево, Московское ш. 55, А

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, кафедра генетики, разведения и биотехнологии животных, Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское ш. 2, 196601  
E-mail: pozovnikova@gmail.com<sup>1</sup>; valevskaya@bk<sup>2</sup>; kudinov\_aa@list.ru<sup>1</sup>; dementevan@mail.ru<sup>1</sup>

*В последние годы в молочном скотоводстве ведется селекция, направленная на повышение показателей молочной продуктивности. При этом, наблюдается снижение фертильности коров, и как следствие ранняя выбраковка животных. Это связано с тем, что причины ухудшения воспроизводства не всегда возможно определить, а признаки сложно измерить. Одной из причин нарушений фертильности коров рассматривают снижение качества ооцитов, способных к оплодотворению. Поэтому, изучение вопроса соотношения количества и качества ооцитов, способных к оплодотворению с уровнем молочной продуктивности коров, а также в связи с полиморфными вариантами генов *GH*, *PRL* и *Pit-1* представляет научный интерес. Целью нашей работы было выявление зависимости качества и количества ОКК коров, полученных *post mortem*, от уровня молочной продуктивности и генетического профиля по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1*. Отмечена высокая частота встречаемости аллеля *L* гена *GH* – 0,942, аллеля *A* гена *PRL* – 0,898 и аллеля *B* гена *Pit-1* – 0,710. Высокий выход ОКК в среднем на один яичник получен в группе животных с генотипом *LL* гена *GH* (*LL* к *LV* +7,54 шт,  $p \leq 0,05$ ), при этом из них получено значимое количество жизнеспособных (*LL* к *LV* +4,5 шт,  $p \leq 0,05$ ). У особей с генотипом *AA* гена *PRL* количество выделенных жизнеспособных ОКК в среднем на один яичник было выше по сравнению с коровам с генотипом *AB* (+4,84 шт,  $p \leq 0,05$ ). Животные с генотипом *LV* превосходили своих сверстниц с генотипом *LL* гена *GH* по выходу молочного жира и белка на 8,3 кг ( $p \leq 0,05$ ) и на 6,0 кг ( $p \leq 0,01$ ) соответственно. Расчет средней племенной ценности животных в группах в зависимости от количества ОКК не выявил достоверных различий.*

**Ключевые слова:** Крупный рогатый скот, молочная продуктивность, ген *GH*, ген *PRL*, ген *Pit-1*, ооцит-кумуляционный комплекс, морфология ооцитов.

© М.В. ПОЗОВНИКОВА, Л.Н. РОТАРЬ,  
А.А. КУДИНОВ, Н.В. ДЕМЕНТЬЕВА, 2020

**Введение.** Ухудшение воспроизводства высокопродуктивных стад наносит существенный экономический урон хозяйствам [1]. Поэтому на сегодняшний день все больше внимания уделяют параметрам, характеризующим здоровье животных, одним из которых является фертильность самок. В отличие от быков, репродуктивная способность коров определяется множеством факторов, таких как восстановление полового цикла после отела и наступление охоты, а также наличие морфологически интактных яйцеклеток, способных к оплодотворению. Изучение генетики фертильности осложняется множеством детерминант внешней среды, оказывающих влияние на репродуктивное здоровье коров. [2]. Изучение молекулярно-генетических механизмов регуляции репродуктивных признаков расширит знания в этой области, что в свою очередь ускорит селекционный прогресс.

Признаки воспроизводства контролируются большим количеством генов, имеют низкую степень наследования и находятся в отрицательной корреляции с молочной продуктивностью. [3]. Выбор гена-кандидата основывается на его влиянии на физиологические процессы, роли в метаболических путях и локализации вблизи уже описанных локусов количественных признаков (QTL – Quantitative Trait Loci) [4]. Как известно нервная и эндокринная регуляция продуктивности сельскохозяйственных животных осуществляется комплексно, а главными регуляторами овариальной функции у млекопитающих являются гормоны гипофиза и гипоталамуса. В передней доле гипофиза вырабатываются гормоны соматотропин и пролактин, играющие

важную роль в организме млекопитающих [5]. Соматотропин (гормон роста, *GH*) является важным фактором развития фолликулов в яичнике млекопитающих [6]. Он играет важную роль в контроле репродукции в тех аспектах, которые связаны с делением клеток, фолликулогенезом яичников, оогенезом и секреторной активностью [7]. Пролактин – относится к семейству белковых гормонов, который необходим для поддержания беременности, лактации и проявления действия гормона желтого тела – прогестерона. Предполагается, что высокий уровень пролактина у самок может тормозить функциональную активность яичников [8]. Ген гипофизарного фактора транскрипции также может рассматриваться как потенциальный ДНК-маркер, так как отвечает за экспрессию генов соматотропина и пролактина. Н. Khatib et al. (2009) показали, что гены сигнального пути *Pit-1* ассоциированы с показателями оплодотворения и выживаемости эмбрионов *in vitro*. [9].

Среди прочих причин в патогенезе нарушения фертильности высокопродуктивных коров выделяют качество яйцеклеток и эмбрионов [10]. Также отмечается, что причиной низкой оплодотворяемости коров и ранней эмбриональной смертности может быть снижение качества ооцитов у высокопродуктивных коров [11].

Поэтому, изучение вопроса соотношения количества и качества ооцитов, способных к оплодотворению с уровнем молочной продуктивности коров, а также в связи с полиморфными вариантами генов *GH*, *PRL* и *Pit-1* представляет научный интерес.

Целью нашей работы было выявление зависимости количества и жизнеспособности ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) коров, полученных *post mortem*, от уровня молочной продуктивности и генетического профиля по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1*.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось в период 2017–2019 гг. на базе ВНИИГРЖ и ФГБОУ ВО СПбГАУ. Выборку составили животные из трех стад, разных хозяйств Ленинградской области (21 голова, 39 голов и 9 голов), выбракованные по причине заболеваний вымени и конечностей. Материалом для исследования являлись ооцит-куму-

люсные комплексы, выделенные из 138 яичников коров ( $n = 69$ ) голштинизированной черно-пестрой породы, *post mortem*, а также образцы ДНК, полученные из овариальной ткани. Овариоэктомия проводилась сразу после убоя животного. Яичники доставляли в лабораторию при температуре 37 °С в 0,9%-ном растворе NaCl в течение 1 ч. Для экспериментов отбирали яичники на стадии фолликулярного роста (не содержащие corpus luteum) и на стадии желтого тела, без видимой патологии. В лаборатории яичники освобождали от остатков яйцеводов и трижды промывали в физиологическом растворе. Затем, в предварительно промаркированную чашку Петри, помещали яичник в небольшом количестве 0,9%-ного раствора NaCl, после чего проводили его резекцию. Визуализировали ОКК с использованием стереоскопического микроскопа при увеличении  $\times 28$ . Морфологическая оценка ооцит-кумулюсных комплексов включала: состояние кумулюса (количество слоев кумулюсных клеток и компактность), гомогенность и цвет ооплазмы ооцита, наличие включений, равномерность зоны пеллюцида (*zona pillucida* – ZP), размер ооцита и его тургор. Ооцит-кумулюсные комплексы, имеющие 1 и более слоев кумулюса, серую, гомогенную ооплазму, равномерную по ширине ZP, нормальный размер (110–120 мкм) и тургор, были определены как морфологически полноценные (жизнеспособные). Денудированные ооциты или ОКК, имеющие кумулюс с признаками дегенерации, ооциты с темной ооплазмой, расширенной ZP размером менее 110 мкм, плохим тургором и деформированные, считались не жизнеспособными. Учитывались показатели: общее количество ОКК, ОКК среднее на один яичник, количество жизнеспособных ОКК, среднее количество жизнеспособных ОКК на один яичник.

ДНК из ткани яичников выделяли фенольным методом, с использованием протеиназы К. Генотипирование осуществляли методом ПЦР-ПДРФ. Для амплификации использовали следующие пары праймеров (ООО «Евроген», Россия): *GH* F:5'-gct-gct-cct-gag-ggc-cct-tcg-3'. R:5'-gcg-gcg-gca-ctt-cat-gac-cct-3' [12]; *PRL*: F:5'-cga-gtc-ctt-atg-agc-ttg-att-ctt-3', R:5'-gcc-ttc-cag-agg-tcg-ttt-gtt-ttc-3' [13]; *Pit-1*: F: 5' aaa-cca-tca-

tct-ccc-ttc-tt-3'; R: 5'aat-gta-caa-tgt-ctt-ctg-ag-3' [14]. Амплификацию проводили на амплификаторе «Bio-Rad» (T-100 Bio-Rad, Laboratories, Inc.) в следующем режиме: горячий старт 95 °С – 5 мин, и далее 35 циклов: 95 °С – 30 с, отжиг праймеров 68 °С (*GH*), 60 °С (*PRL*), 56 °С (*Pit-1*) и элонгация – 72 °С – 10 мин. Полученный продукт амплификации рестрицировали эндонуклеазами *AluI*, *RsaI* и *HinfI* соответственно (ООО «СибЭнзим», Россия) при 37 °С, в течение 3 ч. Рестрикты разделяли на 2%-ном агарозном геле с добавлением флуоресцентного красителя – бромистого этидия в течение 1,5 ч при рабочем напряжении 100 В и идентифицировали с помощью видеосистемы гель-документирования Gel Imager-2 (ООО Компания «Хеликон», Россия).

Оценка взаимосвязи продуктивности животных с количеством ооцит-кумулясных комплексов производилась с использованием племенной ценности (ПЦ) коров по признакам молочной продуктивности, рассчитанной с помощью BLUP Animal Model, где учитывались фенотипические данные продуктивности коров 2000–2013 гг. рождения из 49 племенных заводов и репродукторов голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области. [15]. Решение уравнения смешанной модели проводилось с помощью программного обеспечения MiX99 [16]. Расчет средней, ошибки среднего и коэффициента корреляции проводился в программной среде RStudio [17]. Для статистической оценки полученных данных использовали методы вариационной статистики [18]. Для обработки результатов использовали Microsoft Excel и Atte Stat. Достоверность различия сравниваемых значений (средние значения и их стандартные ошибки) оценивали с использованием критерия Фишера в случае их нормального распределения или критерия Манна-Уитни или Уилкинсона при его отсутствии. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты.** Всего исследовано 138 яичников, из которых было выделено 1080 ооцит-кумулясных комплексов из них жизнеспособных – 42,9 % ( $n = 464$ ). Анализ морфофункционального статуса яичников показал, что 36,2 % ( $n = 50$ ) из них находились в лютеино-

вой фазе и 63,8 % ( $n = 88$ ) – в фазе фолликулярного роста. Из яичников с желтым телом всего выделено 348 ОКК, из них 46,2 % ( $n = 161$ ) жизнеспособных. Из яичников, находящихся в фолликулярной стадии всего выделено 732 ОКК, из которых 41,4 % ( $n = 303$ ), по морфологическим характеристикам, определены как жизнеспособные. По результатам анализа данных не выявлено достоверных различий по количеству ОКК полученных в среднем на один яичник в лютеиновой фазе ( $7,60 \pm 0,77$ ) и на стадии фолликулярного роста ( $8,36 \pm 0,69$ ), в том числе и жизнеспособных ( $3,28 \pm 0,54$  против  $3,44 \pm 0,49$ ), в зависимости от морфологической характеристики яичника. В целом по всей выборке наблюдается положительная корреляция по признаку общий выход ОКК-выход жизнеспособных ОКК ( $r = 0,669$  при  $p \leq 0,001$ ),

На основании полученных электрофореграмм были рассчитаны частоты генотипов и аллелей по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1* в анализируемой выборке коров. По гену *GH* определено только два генотипа LL и LV с частотой 0,884 и 0,116 соответственно. Выявлена высокая встречаемости аллеля L – 0,942, а аллель V определен как редкий (0,058). Анализ фактического и теоретического распределения генотипов по гену *GH* методом Харди-Вайнберга, не выявил нарушения генного равновесия (показатель варибельности  $\chi^2 = 0,26$ ,  $N_{\text{exp}} = 0,109$ ).

По гену *PRL* большая часть животных обладала генотипом AA гена *PRL* (0,797) и только у 14-ти голов определен гетерозиготный генотип АВ (0,203). Частота аллеля А была на уровне 0,898, а аллеля В – 0,102. Анализ данных показал, что генное равновесия в данной выборке животных не нарушено ( $\chi^2 = 0,86$ ,  $N_{\text{exp}} = 0,183$ ).

При анализе полиморфизма гена *Pit-1* определено три типа генотипов: AA, АВ и ВВ. Их частота составила 0,058 0,464 и 0,478 соответственно. Более половины анализируемых животных имели в своем генотипе аллель В (частота 0,710), аллель А оказался редким, и его частота составила 0,290. Показатель  $N_{\text{exp}} = 0,411$ , значение  $\chi^2 = 1,11$ , что свидетельствует о том, что генное равновесия в данной выборке животных не нарушено.

Связь различных генотипов по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1* с качеством и количеством полученных ОКК из яичников коров показана в табл. 1.

Животные с генотипом LL в сравнении с особями с генотипом LV гена *GH* отличались высоким выходом ОКК в среднем на один яичник (LL к LV +7,54 шт.,  $p \leq 0,05$ ), а также высоким выходом жизнеспособных ОКК (LL к LV +4,5 шт.,  $p \leq 0,05$ ). Не определено достоверных различий между группами животных с генотипами AA и AB гена *PRL* по показателю ОКК в среднем на голову, однако из яичников коров с генотипом AA было получено большее количество жизнеспособных ОКК (+4,84 шт.,  $p \leq 0,01$ ). Анализ связи полиморфных вариантов гена *Pit-1* с количеством и качеством ОКК не выявил значимых различий в исследуемой группе особей.

Комплексное маркирование признака считается более эффективным, поэтому в на-

шей работе было проведено определение генетической структуры анализируемого поголовья по комплексу генотипов генов *GH*, *PRL* и *Pit-1*. Из 27 теоретически ожидаемых генотипов было определено только 9 комплексных генотипов *GH/PRL/Pit-1*. В оценку было включено только три группы, где  $n \geq 5$ . Изучение комплексного влияния пула анализируемых генов на исследуемые параметры показало, что низкий выход ОКК (в том числе и жизнеспособных) наблюдался в группе животных с генотипом LL/AB/AB в сравнении с группой особей с генотипом LL/AA/BB (-8,0 и -5,95 соответственно при  $p < 0,05$ ). Учитывая отсутствие связи полиморфных вариантов гена *Pit-1* с анализируемыми признаками, можно отметить, что наличие в комплексных генотипах гомозиготных вариантов аллеля L гена *GH* и аллеля A гена *PRL* положительно влияет как на общее количество ОКК, так и на их качественные признаки (морфологическое сос-

Таблица 1. Качество и количество ооцит-кумулясных комплексов полученных из яичников коров с различными генотипами по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1*

Генотип	<i>n</i> голов	<i>n</i> яичников	Выделено ОКК, всего (шт.)	ОКК, всего, среднее на 1 голову (шт.)	ОКК, жизнеспособные (шт.)	% жизнеспособных ОКК от ОКК всего	ОКК, жизнеспособные, среднее на 1 голову (шт.)
<i>GH</i>							
LL	61	122	1008	16,52 ± 1,38 <sup>a</sup>	442	43,8	7,25 ± 1,01 <sup>c</sup>
LV	8	16	72	9,00 ± 1,73 <sup>b</sup>	22	30,5	2,75 ± 0,77 <sup>d</sup>
Итого	69	138	1080	—	464	—	—
<i>PRL</i>							
AA	55	110	892	16,22 ± 1,51	424	47,5	7,70 ± 1,09 <sup>e</sup>
AB	14	28	188	13,42 ± 1,93	40	21,3	2,86 ± 0,60 <sup>f</sup>
Итого	69	138	1080	—	464	—	—
<i>Pit-1</i>							
AA	4	8	38	9,50 ± 1,04	17	44,7	4,25 ± 1,70
AB	32	64	484	15,12 ± 1,77	215	44,4	6,72 ± 1,20
BB	33	66	558	16,91 ± 2,00	232	41,6	7,03 ± 1,51
Итого	69	138	1080	—	464	—	—
<i>Комплексные генотипы GH/PRL/Pit-1</i>							
LL/AA/AB	22	44	384	17,45 ± 2,38	181	47,1	8,22 ± 1,60
LL/AA/BB	24	48	432	18,00 ± 2,47 <sup>g</sup>	215	49,7	8,95 ± 1,92 <sup>i</sup>
LL/AB/AB	7	14	70	10,00 ± 0,87 <sup>h</sup>	21	30,0	3,00 ± 0,69 <sup>j</sup>

Примечание. Уровни достоверности различий между группами: a–b, c–d, g–h, i–j  $p \leq 0,05$ ; e–f  $p \leq 0,01$ .

тояние). Этот факт подтверждается данными корреляционного анализа. Так в группе животных с генотипом LL гена *GH* коэффициент корреляции по признаку общее количество ОКК – жизнеспособные ОКК составил 0,662 при  $p \leq 0,001$ , а в группе особей с генотипом AA гена *PRL* – 0,797 при  $p \leq 0,001$ . Наличие в комплексном генотипе гетерозиготного варианта АВ гена *PRL* ассоциированного с низким выходом жизнеспособных ОКК, вероятно может обуславливать снижение анализируемых показателей. Коэффициент корреляции по признаку общее количество ОКК – ОКК жизнеспособные в группе особей с генотипом АВ гена *PRL* отрицательный ( $r = -0,120$ ).

Так как уровень молочной продуктивности тесно связан с репродуктивными качествами коров, нами была проведена оценка связи полиморфных вариантов изучаемых генов с показателями ПЦ удой, ПЦ жир, ПЦ белок. Анализ показал, что только животные с генотипом LL уступали своим сверстницам с генотипом LV гена *GH* по выходу молочного жира и белка на 8,3 кг ( $p \leq 0,05$ ) и на 6,0 кг ( $p \leq 0,01$ ) соответственно и имели тенденцию к низким показателям по удою. По остальным SNP ана-

лизируемых генов достоверных различий не получено.

Для определения связи уровня молочной продуктивности коров с изучаемыми параметрами ОКК все животные были разделены на группы в зависимости от общего выхода и жизнеспособности ооцит-кумулясных комплексов. Статистическая группировка проводилась на основе количественных (общее количество ОКК) и качественных (жизнеспособность ОКК) признаков. Учитывая, что распределение значений признаков отклоняется от нормального, критерием разделения на группы был показатель медианы. Оценку связи выхода жизнеспособных ОКК с уровнем ПЦ по показателям молочной продуктивности проводили внутри групп по общему выходу ОКК (табл. 3).

Согласно анализу, повышение показателя ПЦ по удою, молочному жиру и белку наблюдается в группе животных с высоким общим выходом ОКК. Противоположная ситуация обнаружена при анализе групп по выходу жизнеспособных ОКК: высокие средние значения ПЦ по молочной продуктивности отмечаются в группах с низким выходом жизнеспособных

Таблица 2. Показатели молочной продуктивности (ПЦ) групп животных с различными генотипами генов *GH*, *PRL* и *Pit-1*

Генотип	<i>n</i>	ПЦ удой, кг	ПЦ жир, кг	ПЦ белок, кг
<i>GH</i>				
LL	55	75,9 ± 34,9	-15,9 ± 1,22 <sup>a</sup>	-23,1 ± 0,7 <sup>c</sup>
LV	5	204,3 ± 65,6	-7,6 ± 3,5 <sup>b</sup>	-17,1 ± 1,4 <sup>d</sup>
<i>PRL</i>				
AA	48	75,8 ± 38,8	-15,8 ± 1,3	-23,1 ± 0,7
AB	12	129,7 ± 51,4	-12,6 ± 2,4	-20,1 ± 1,3
<i>Pit-1</i>				
AA	4	-24,4 ± 148,8	-20,4 ± 3,5	-24,9 ± 2,5
AB	28	139,7 ± 45,9	-14,1 ± 1,6	-21,8 ± 1,0
BB	28	49,4 ± 48,1	-15,6 ± 1,84	-22,9 ± 1,6
<i>Комплексные генотипы GH/PRL/Pit-1</i>				
LL/AA/AB	21	127,9 ± 58,7	-14,9 ± 2,1	-22,9 ± 1,1
LL/AA/BB	21	23,8 ± 57,6	-17,0 ± 2,12	-23,8 ± 1,2
LL/AB/AB	5	115,4 ± 56,0	-13,6 ± 3,2	-19,5 ± 1,7

Примечание. Уровень достоверности a–b  $p \leq 0,05$ ; c–d  $p \leq 0,01$ .

ОКК. Коэффициент корреляции между группами близок к единице.

Так как сравнение средних показателей ПЦ по признаку молочной продуктивности в зависимости от общего выхода ОКК и выхода жизнеспособных ОКК не выявило достоверных различий, то нами был проведен регрессионный анализ.

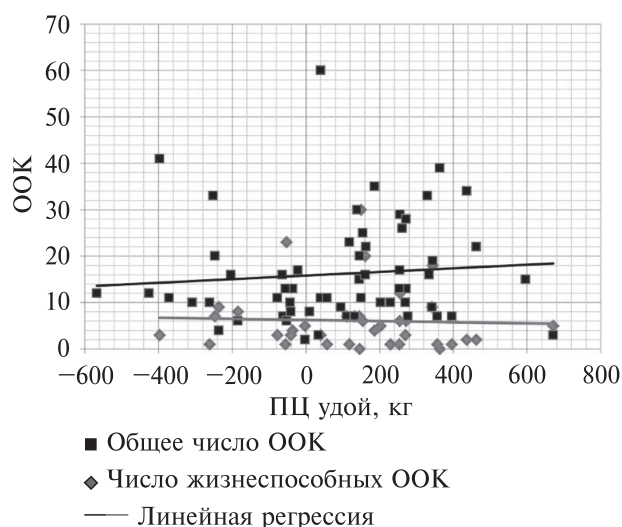
На рис. 1 отображены уравнения линейной регрессии между ПЦ по признаку удой (кг) и числооцит-кумулясных комплексов. Значения линейной регрессии для общего числа ОКК  $R^2 = 0,008$ ;  $\beta = 0,09$ ; ANOVA F-тест = 0,046;  $p = 0,502$  и числа жизнеспособных ОКК  $R^2 = 0,001$ ;  $\beta = -0,035$ ; ANOVA F-тест = 0,07;  $p = 0,792$ .

На рис. 2 отображены уравнения линейной регрессии между ПЦ по признаку молочной жир (кг) и числу ооцит-кумулясных комплексов. Значения линейной регрессии для общего числа ОКК  $R^2 = 0,007$ ;  $\beta = 0,86$ ; ANOVA F-тест = 0,43;  $p = 0,52$  и числа жизнеспособных ОКК  $R^2 = 0,0$ ;  $\beta = -0,015$ ; ANOVA F-тест = 0,013;  $p = 0,909$ .

На рис. 3 отображены уравнения линейной регрессии между ПЦ по признаку молочной белок (кг) и числу ооцит-кумулясных комплексов. Значения линейной регрессии для общего числа ОКК  $R^2 = 0,0$ ;  $\beta = -0,013$ ; ANOVA F-тест = 0,01;  $p = 0,92$  и числа жизнеспособных ОКК  $R^2 = 0,001$ ;  $\beta = -0,034$ ; ANOVA F-тест = 0,069;  $p = 0,794$ .

**Обсуждения.** Полученные нами данные свидетельствуют о том, что количество жизнеспособных ОКК не зависит от морфофункционального состояния яичников коров, что согласуется с данными [19] которые показали, что из яичников в лютеиновой стадии полового цикла процент ооцитов, пригодных к культивированию вне организма, составил 49,2 %, в фолликулярной – 45,6 %.

Если рассматривать количественный и качественный показатели ОКК как биомаркер репродуктивного потенциала коров, то в нашем исследовании не установлено прямой зависимости между выходом ОКК и уровнем ПЦ по показателям молочной продуктивности животных, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к положительной связи ПЦ по молочной продуктивности и общим количеством

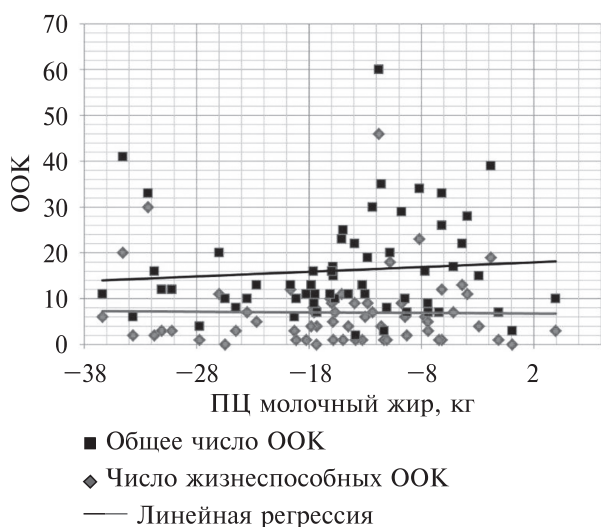


**Рис. 1.** Линейная регрессия между ПЦ по признаку удой (кг) и числу ооцит-кумулясных комплексов. Значения линейной регрессии для общего числа ОКК  $R^2 = 0,008$ ;  $\beta = 0,09$ ; ANOVA F-тест = 0,046;  $p = 0,502$  и числа жизнеспособных ОКК  $R^2 = 0,001$ ;  $\beta = -0,035$ ; ANOVA F-тест = 0,07;  $p = 0,792$

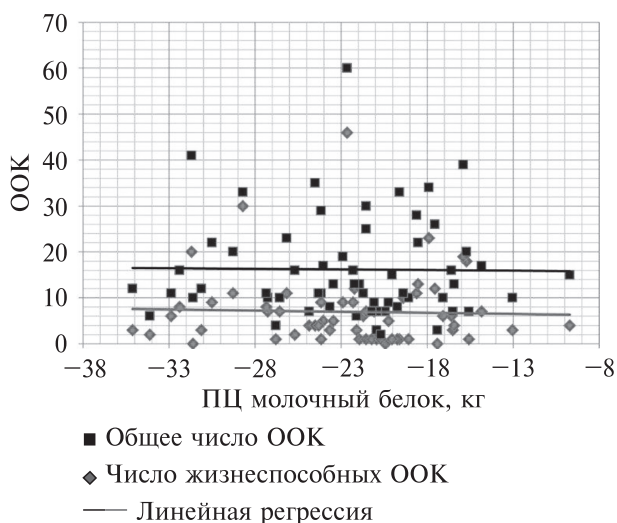
ОКК и отрицательной связи уровня ПЦ по молочной продуктивности и выходу жизнеспособных ОКК, но данные недостоверны.

**Таблица 3. Показатели ПЦ по молочной продуктивности в зависимости от общего количества ОКК и количества жизнеспособных ОКК**

Группа	ПЦ удой	ПЦ молочный жир	ПЦ молочный белок
	кг		
<i>Общий выход ОКК</i>			
≤12 ОКК <i>n</i> = 30	26,5±48,5	-16,3±1,7	-23,2±1,0
≥13 ОКК <i>n</i> = 30	146,9±41,8	-14,1±1,5	-21,9±0,9
<i>Выход жизнеспособных ОКК</i>			
≤ 3 ОКК <i>n</i> = 19	33,7±68,5	-16,0±2,5	-22,8±1,4
≥ 4 ОКК <i>n</i> = 11	13,6±63,3	-17,1±2,3	-23,8±1,3
≤ 9 ОКК <i>n</i> = 18	181,1±43,1	-13,7±1,5	-21,7±1,2
≥ 10 ОКК <i>n</i> = 12	95,6±82,1	-14,5±3,2	-22,1±1,6



**Рис. 2.** Линейная регрессия между ПЦ по признаку молочный жир (кг) и числу ооцит-кумулюсных комплексов. Значения линейной регрессии для общего числа ООК  $R^2 = 0,007$ ;  $\beta = 0,86$ ; ANOVA F-тест =  $0,43$ ;  $p = 0,52$  и числа жизнеспособных ООК  $R^2 = 0,0$ ;  $\beta = -0,015$ ; ANOVA F-тест =  $0,013$ ;  $p = 0,909$



**Рис. 3.** Линейная регрессия между ПЦ по признаку молочный белок (кг) и числу ооцит-кумулюсных комплексов. Значения линейной регрессии для общего числа ООК  $R^2 = 0,0$ ;  $\beta = -0,013$ ; ANOVA F-тест =  $0,01$ ;  $p = 0,92$  и числа жизнеспособных ООК  $R^2 = 0,001$ ;  $\beta = -0,034$ ; ANOVA F-тест =  $0,069$ ;  $p = 0,794$

Нельзя недооценивать влияние генетического фактора на продуктивность и фертильность животных. Генетическая дисперсия и плеио-

тропное действие генов, не всегда позволяют ответить на вопрос насколько значимый вклад вносит один или другой ген в формирование признака. И чаще всего, полученные данные могут являться некоторой особенностью анализируемой популяции, так как значительную роль в фенотипическом проявлении признака оказывает окружающая среда [20]. По данным ряда авторов для голштинизированной чернопестрой породы в которой в последние десятилетия ведется направленная селекция на повышение удоев, характерна высокая частота встречаемости аллеля L гена *GH* –  $0,93$  [21], аллеля A гена *PRL* –  $0,870$  [22], и аллеля B гена *Pit-1* –  $0,667-0,880$  [23]. Основываясь на полученных нами данных, можно отметить равномерность распределения генотипов по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1* в анализируемой выборке животных. Наибольшая частота встречаемости определена для аллеля L гена *GH* ( $0,942$ ), аллеля A гена *PRL* ( $0,898$ ) и аллеля B гена *Pit-1* ( $0,710$ ), что свидетельствует о проводимой селекции по признакам молочной продуктивности в хозяйствах.

Изучение влияния отдельных полиморфных вариантов генов на изучаемые признаки выявил некоторую тенденцию к отрицательной взаимосвязи количества ОКК и показателя ПЦ по удою, молочному жиру и белку. Достоверные данные были получены только по гену *GH*. Так, генотип LV гена *GH* был отрицательно связан как с общим выходом ОКК, так и с выходом жизнеспособных ОКК. В то же время особи с данным генотипом отличались высокими показателем ПЦ по молочному жиру и белку и имели тенденцию к высоким удоям. Полученные данные можно объяснить тем, что ген *GH* имеет значительное влияние на метаболические процессы в организме млекопитающих. Авторами [24] отмечается, что особи с генотипом LV гена *GH* имели высокую резистентность к инсулину, что определяло их значительный генетический потенциал к высоким удоям. В то же время исследователями [25] показано, что высокая резистентность к инсулину у лактирующих коров ассоциирована с низкой компетентностью ооцитов, а, следовательно, и с низкой фертильностью коров.

Хотя генотип AA гена *PRL* был ассоциирован с высоким выходом жизнеспособных ОКК, не было получено достоверной взаимосвязи по признакам молочной продуктивности, но была отмечена некоторая тенденция у этих животных к низким показателям по удою, молочному жиру и белку. О положительной связи генотипа AA с репродуктивными признаками коров было сообщено Рачковой Е.Н. (2017), в работе которой животные с генотипом AA имели высокий индекс плодовитости и короткий межтепельный период [26]. Отсутствие достоверных связей полиморфных вариантов гена *Pit-1* с молочной продуктивностью и репродуктивными качествами отражено в ряде работ [27, 28], что подтверждает полученные нами результаты.

Таким образом, основываясь на полученных нами данных можно предположить, что интенсивный и односторонний отбор животных по показателям молочной продуктивности может отрицательно влиять на качество ОКК самок, что в свою очередь будет фенотипически выражаться снижением репродуктивных качеств коров.

**Соответствие этическим стандартам.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена в соответствии с темой Министерства образования Российской Федерации, номер госрегистрации – АААА-А18-118021590138-1.

THE LINKAGE OF POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES *GH*, *PRL*, *PIT-1* AND MILK PRODUCTIVITY OF COWS WITH MORPHOLOGY OF CUMULUS-OOCYTE COMPLEX, SAMPLED POST MORTEM

*M.V. Pozovnikova, L.N. Rotar, A.A. Kudinov, N.V. Dementieva*

Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K.Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry (RRIFAGB), 55A, Moskovskoe sh., pos. Tyarlevo, St. Petersburg-Pushkin, 196625 Russia.  
Saint-Petersburg State Agrarian University, 2, Peterburgskoe sh., St. Petersburg-Pushkin, 196601 Russia

In recent years the aim of dairy cattle breeding was to increase milk production traits. At the same time, there is observed decrease of fertility traits of cows, and as a result, early culling of animals. This fact may be explained by an almost impossibility to determine the reasons of aggravated reproduction, and the difficulty of estimating them. One of the causes of a decrease in the fertility of cows is the decline in the quality of oocytes, capable of fertilization. Therefore, the study of the ratio between the number and quality of oocytes, capable of fertilization, and the level of milk productivity of cows, as well as the connection with polymorphic variants of the *GH*, *PRL*, and *Pit-1* genes, is of scientific interest. The aim of our work was to determine the dependence of the quality and quantity of postmortem cow oocytes on the level of milk productivity and genetic profile for the genes *GH*, *PRL* and *Pit-1*. There was a high incidence of allele L of the *GH* gene – 0,942, allele A of the *PRL* gene – 0,889 and allele B of the *Pit-1* gene – 0,710. The data obtained showed that a high yield of COC on average per ovary was obtained in a group of animals with the LL genotype of the *GH* gene (LL to LV +7,54 pcs,  $p \leq 0,05$ ), along with a significant amount of viable (LL to LV +4,5 pcs,  $p \leq 0,05$ ). In individuals with the AA genotype of the *PRL* gene, the number of isolated viable COCs on average per ovary was higher compared to those with the AB genotype (+4,84 pcs,  $p \leq 0,05$ ). An analysis of the association of polymorphic variants of the *Pit-1* gene with the quantity and quality of COC did not reveal significant differences in the studied group of individuals. The assessment of the relationship of polymorphic variants of the studied genes with the indicators of breeding value (BV) yield, fat and protein showed that only animals with the LV genotype exceeded their peers with the LL genotype of the *GH* gene in milk fat and protein output by 8,3 kg ( $p \leq 0,05$ ) and 6,0 kg ( $p \leq 0,01$ ), respectively. For the remaining SNP of the analyzed genes, no significant differences were obtained.

ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *GH*, *PRL*, *PIT-1* І МОЛОЧНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ КОРІВ З МОРФОЛОГІЄЮ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ, ОТРИМАНИХ POST MORTEM

*M.V. Pozovnikova, L.N. Rotar, A.A. Kudinov, N.V. Dementieva*

Метою нашої роботи було виявлення залежності якості і кількості ооцит-кумулясного комплексу (ОКК) корів, отриманих post mortem, від рівня молочної продуктивності і генетичного профілю за генами *GH*, *PRL* і *Pit-1*. Відзначено високу частоту народження алелю L гена *GH* – 0,942, алелю A гена *PRL* – 0,898 і алелю B гена *Pit-1* – 0,710. Високий



вихід ОКК в середньому на один яєчник, отриманий в групі тварин з генотипом LL гена *GH* (LL до LV +7,54 шт.,  $p \leq 0,05$ ), при цьому з них отримано значну кількість життєздатних (LL до LV +4,5 шт.,  $p \leq 0,05$ ). У особин з генотипом AA гена *PRL* кількість виділених життєздатних ОКК в середньому на один яєчник була вище в порівнянні з коровам з генотипом АВ (+4,84 шт.,  $p \leq 0,05$ ). Тварини з генотипом LV перевершували своїх ровесниць з генотипом LL гена *GH* по виходу молочного жиру і білка на 8,3 кг ( $p \leq 0,05$ ) і на 6,0 кг ( $p \leq 0,01$ ) відповідно. Розрахунок середньої племінної цінності тварин у групах, в залежності від кількості ОКК, не виявив достовірних відмінностей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jonas, E., Koning, D.J., Genomic selection needs to be carefully assessed to meet specific requirements in livestock breeding programs, *Front. Genet.*, 2015, vol. 6, pp. 49. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00049>.
- LeBlanc, S., Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle, *J. Reprod. Develop.*, 2010, vol. 56, no. 5, pp. S1–S7. doi: 10.1262/jrd.1056S01.
- Yakovlev, A.F., Plemjashov, K.V., Molecular markers in the increase of dairy cattle reproduction, *Anim. Genet. Breed.*, 2017, no. 4, pp. 3–11.
- Yudin, N.S., Voevoda, M.I., Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle, *Rus. J. Genet.*, 2015, vol. 51, no. 5, pp. 600–12. doi: 10.7868/S0016675815050082.
- Grin, N., Staut, U., and Tejlor, D., *Biologiya*, Moscow, 1990.
- Shimizu, T., Murayama, C., Sudo, N., Kawashima, C., Tetsuka, M., and Miyamoto, A., Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary, *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, vol. 106, no. 1–2, pp. 143–52. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.04.005>.
- Ola, S.I., Ai, J.S., and Liu, J.H., Effects of gonadotropins, growth hormone, and activin on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion, *Mol. Reprod. Develop.*, 2008, vol. 75, pp. 89–96. <https://doi.org/10.1002/mrd.20762>.
- McNeilly, A.S., Glasier, A., Jonassen, J., and Howie, P.W., Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. Reproduction, *Fert. Develop.*, 1982, vol. 65, no. 2, pp. 559–69. doi: 10.1530/jrf.0.0650559.
- Khatib, H., Huang, W., and Wang, X., Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle, *J. Dairy Sci.*, 2009, vol. 92, no. 5, pp. 2238–47. doi: 10.3168/jds.
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., and Rizos, D., Embryo development in dairy cattle. *Theriogenol.*, 2016, vol. 86, no. 1, pp. 270–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>.
- Moore, S.G., Cummins, S.B., Mamo, S., Lonergan, P., Fair, T., and Butler, S.T., Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: VI. Oocyte developmental competence and embryo development, *J. Dairy Sci.*, 2019, vol. 102, no. 5, pp. 4651–61. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15813>.
- Schlee, P., Graml, R., and Schalleberger, E., Growth hormone and insulin-like growth factor-I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes, *Theor. Appl. Genet.*, 1994, vol. 88, no. 3–4, pp. 497–500. <https://doi.org/10.1007/BF00223667>.
- Mitra, A., Schelee, P., and Balakrishnan, C.R., Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and Buffalo, *J. Anim. Breed. Genet.*, 1995, vol. 112, no. 1–6, pp. 71–4. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.1995.tb00543.x>.
- Woollard, J., Schmitz, C.B., and Freeman, A.E., Rapid communication: *HinfI* polymorphism at the bovine *Pit-1* locus, *Anim. Sci.*, 1994, vol. 72, no. 12, 3267.
- Kudinov, A., Juga, J., Mäntysaari, E.A., Strandén, I., Saksa, E.I., Smaragdov, M.G., and Uimari, P., Developing a genetic evaluation system for milk traits in Russian black and white dairy cattle, *Agric. Food Sci.*, 2018, vol. 27, pp. 85–95. <https://doi.org/10.23986/afsci.69772>.
- MiX99 Development Team (2015). MiX99: A software package for solving large mixed model equations. Release VIII/2015. Natural Resources Institute Finland (Luke). Jokioinen, Finland. URL: <http://www.luke.fi/mix99>.
- RStudio Team. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. 2015. <https://www.rstudio.com/>. Accessed 27 Jul 2018.
- Merkur'eva, E.K., *Geneticheskie osnovy selekcii v skotovodstve* Moscow, 1977.
- Letkevitch, L.L., Gandzha, A.I., Kostikova, I.V., Rakovitch, E.D. Condition of Oocyte-cumuli Complexes of Cullled Cows and Their In Vitro Fertilization Ability, *Zootechn. Sci. Belarus*, 2008, vol. 43, no. 1, pp. 81–7.
- Xiang, R., MacLeod, I.M., Bolormaa, S., and Goddard, M.E., Genome-wide comparative analyses of correlated and uncorrelated phenotypes identify major pleiotropic variants in dairy cattle, *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 9248. doi: 10.1038/s41598-017-09788-9.
- Metin Kiyici, J., Arslan, K., Akyuz, B., Kaliber, M., Aksel, E.G., and Zinar, M.U., Relationships between polymorphisms of growth hormone, leptin and myogenic factor 5 genes with some milk yield traits in

- Holstein dairy cows, *International J. Dairy Technol.*, 2018, vol. 8, pp. 1–7. doi: 10.1111/1471-0307.12539.
22. Pozovnikova, M.V., Serdjuk, G.N., Pogorelskiy, I.A., and Tulinova, O.V., Genetic structure of milk cows in relation to DNA-markers and influence of their genotypes on lactation performance, *Dairy Beef Cattle Breed.*, 2016, no. 2, pp. 8–13.
  23. Pozovnikova, M.V., Serdjuk, G.N., The relationship of gene polymorphism of Pit-1 with the productive characteristics of holsteinized black-motley cattle, *Anim. Genet. Breed.*, 2017, no. 4, pp. 37–41.
  24. Balogh, O., Szepes, O., Kovacs, K., Kulcsar, M., Reiczigel, J., Alcazar, J.A., Keresztes, M., Febel, H., Bartyik, J., Fekete, S.G., Fesus, L., and Huszenicza, G., Interrelationships of growth hormone AluI polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows, *Veterin. Med.*, 2008, vol. 53, no. 11, pp. 604–16.
  25. Baruselli, P.S., Vieira, L.M., Sá Filho, M.F., Mingoti, R.D., Ferreira, R.M., Chiaratti, M.R., Oliveira, L.H., Sales, J.N., and Sartori, R., Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows, *Theriogenol.*, 2016, vol. 86, pp. 263–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.039>.
  26. Rachkova, E.N., Associacii genov, svyazannyh s molochnoj produktivnost'yu i rezistentnost'yu k mastitu krupnogo rogatogo skota. Dis. Kand. Biol. Nauk: Kazan', 2017.
  27. Yasemin, Ö.N.E.R., Yilmaz, O., Hayrettin, O.K.U.T., Nezih, A.T.A., Yilmazbaş-Mecitoğlu, G., and Keskin A., Associations between GH, PRL, STAT5A, OPN, PIT-1, LEP and FGF2 polymorphisms and fertility in Holstein-Friesian heifers, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2017, vol. 23, no. 4, pp. 527–34. doi: 10.9775/kvfd.2016.17192.
  28. Grossi, D., Buzanskas, M.E., Grupioni, N.V., de Paz, C.C.P., de Almeida Regitano, L.C., de Alencar, M.M., and Munari, D.P., Effect of IGF1, GH, and PIT1 markers on the genetic parameters of growth and reproduction traits in Canchim cattle, *Mol. Boil. Rep.*, 2015, vol. 42, no. 1, pp. 245–51. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3767-4>.

Поступила в редакцию 17.09.19  
 После доработки 15.11.19  
 Принята к публикации 18.05.20